

بررسی تغییرات نوکلئوتیدی ژن‌های میتوکندریایی ATP6، ND3 و COX3 در بیماران مبتلا به پلاک‌های آترواسکلروتیک با روش PCR-SSCP

محمد مهدی حیدری^{۱*}، مهدی حدادزاده^۲، فرزانه میرزائیان^۱، مریم میرجلیلی^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران؛ ^۲گروه جراحی قلب، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱

چکیده:

زمینه و هدف: آترواسکلروز یک بیماری شریانی چندعاملی است که به دلیل برهمکنش فاکتورهای محیطی و ژنتیکی ایجاد می‌شود. جهش‌های ژنوم میتوکندری احتمالاً اثر مستقیم در افزایش فشار اکسیداتیو دارند و در نتیجه باعث پیشرفت این بیماری می‌شوند. هدف از مطالعه اخیر، شناسایی تغییرات نوکلئوتیدی احتمالی ژن‌های میتوکندریایی ATP6، ND3 و COX3 در بیماران ایرانی مبتلا به پلاک‌های آترواسکلروتیک است.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، از خون محیطی ۹۰ بیمار مبتلا به آترواسکلروز و ۹۵ فرد سالم، DNA ژنومی با روش استاندارد رسوب نمکی جمع‌آوری گردید. نواحی از ژنوم میتوکندری شامل ژن‌های ATP6، ND3 و COX3 با روش PCR-SSCP مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌های دارای شیفت باندی جهت تعیین تغییرات نوکلئوتیدی دقیق، تعیین توالی شدند. داده‌های به‌دست‌آمده حاصل از آزمایشات با تست آماری فیشر (Fisher's exact) و توسط نرم‌افزار آماری Graphpad prism software مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از SSCP و تعیین توالی، منجر به تشخیص سه تغییر نوکلئوتیدی در ژن ATP6 (یک پلی مورفیسم هم معنی در موقعیت m.9034G>A و یک SNP در موقعیت m.9055G>A که طی آن اسیدآمینه آلانین به تیروزین تبدیل می‌شود و یک واریانت هم معنی هتروپلاسمیک در موقعیت m.9162C>T) و سه تغییر نوکلئوتیدی در ژن COX3 شد که عبارت بودند از واریانت هم معنی m.9602A>G و واریانت هم معنی m.9899T>C مربوط به اسیدآمینه هیستیدین و واریانت هموپلاسمی m.9929C>A که منجر به تغییر اسیدآمینه تیروزین به کدون ختم می‌شود. نتیجه‌گیری: از آنجا که ثابت شده است واریانت m.9055G>A خطر پیشرفت سرطان سینه را افزایش می‌دهد و از طرفی این پلی مورفیسم در جمعیت قفقازی مبتلا به پارکینسون نیز گزارش شده است، بنابراین می‌توان گفت که همراهی این جهش با عوامل مستعد کننده دیگر باعث افزایش وخامت بیماری‌های کرونری قلبی می‌شود. بررسی ژن‌های دیگر میتوکندریای می‌تواند در یافتن ارتباط تغییرات نوکلئوتیدی ژنوم میتوکندری با بیماری‌های قلبی-عروقی مهم باشد.

واژه‌های کلیدی: آترواسکلروز، ژنوم میتوکندری، تغییرات نوکلئوتیدی، ATP6، ND3، COX3، PCR-SSCP.

مقدمه:

منجر به رسوب لیپوپروتئین‌های اکسید شده به صورت پلاک‌های چربی در عروق شده و طی آن رگ‌ها باریک و سخت می‌شوند (۳،۲).

پلاک آترواسکلروتیک یک ضایعه چند سلولی می‌باشد که شامل سلول‌های عضله صاف عروق، منوسیت/ ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T و سلول‌های

آترواسکلروز یک بیماری شریانی چندعاملی است که به دلیل برهمکنش فاکتورهای ژنتیکی و محیطی متعدد ایجاد می‌شود. پیشرفت در تکنیک‌های ژنتیک مولکولی، نشان داده است که زمینه ژنتیکی به طور قابل توجهی در استعداد ابتلا به بیماری عروقی آترواسکلروز موثر است (۱). این بیماری التهابی مزمن،

لیپوپروتئین با چگالی پائین (LDL) طبیعی به LDL اکسید شده و منجر به انتقال آن درون فضای تحت اندوتلیال دیواره سرخرگ‌ها می‌شود و ماهیت آتروژنسته آن بروز می‌نماید و به‌عنوان رویداد آغازی برای شروع آترواسکلروز معرفی می‌شود (۱۰).

در میان کمپلکس‌های زنجیره تنفسی میتوکندری، کمپلکس I (NADH-یوبی کوئینون اکسیدوردوکتاز)، اولین و بزرگ‌ترین کمپلکس زنجیره تنفسی است که ۷ پروتئین آن (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) توسط ژنوم میتوکندری کد می‌شود. ژن ND3 پروتئینی را با طول ۱۱۵ اسید آمینه کد می‌کند و در فعالیت کاتالیتیک کمپلکس I نقش مهمی را ایفا می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که این ژن در بیماری‌های متعددی دارای جهش می‌باشد مانند: آنسفالوپاتی، سندروم لی (Leigh)، دیستونیا و نقص در هرکدام از زیر واحدهای کمپلکس I زنجیره تنفسی، به‌تنهایی و یا در ترکیب با دیگر کمپلکس‌ها، احتمالاً بیشترین نقص و اختلال را در زنجیره تنفسی ایجاد می‌کند. ژن ATPase 6 پروتئینی را کد می‌کند که نقش کلیدی در انتقال پروتئین‌ها از غشاء دارد. این پروتئین از یک دمین و ۲۲۶ اسید آمینه تشکیل شده است و چون به‌عنوان کانال پروتون عمل می‌کند، هرگونه نقص می‌تواند باعث بروز اختلال در عملکرد انتقال پروتون شود. ژن COXIII یا سیتوکروم C اکسیداز III پروتئینی را کد می‌کند که باعث احیاء اکسیژن به آب می‌شود. نقص‌های این ژن تاکنون در بیماری‌های متعددی دیده شده‌اند که با نام کلی بیماری‌های کمپلکس IV آن‌ها را می‌شناسند و از اختلافات میوپاتی تا بیماری‌های چند سیستمی وخیم را شامل می‌شود (۱).

با توجه به اینکه مطالعه جامعی که ژن یا جهش ویژه میتوکندریایی را در این بیماری مشخص نماید، وجود ندارد. هدف از این تحقیق، مطالعه بخشی از ژنوم میتوکندری حاوی ژن‌های مربوط به ATP6, ND3 و COX3 در بیماران ایرانی مبتلا به پلاک‌های آترواسکلروتیک با استفاده از روش PCR-SSCP می‌باشد.

التهابی دیگر و چربی‌های داخل و خارج سلولی می‌باشد. فاکتورهای متعدد ژنتیکی و محیطی در بروز آترواسکلروز نقش دارند. فاکتورهای خطر مهم و موثر در بروز آن عبارتند از: استعمال سیگار، فشارخون بالا، دیابت قندی، چاقی، هیپرکلسترولمی، اختلالات ژنتیکی و زمینه خانوادگی که با درجات مختلف به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم در بروز آترواسکلروتیک عروق نقش دارد. جهش‌های سوماتیکی ژنوم میتوکندریایی می‌تواند عامل احتمالی آترواسکلروز باشد (۴،۵).

شواهد مختلف نشان می‌دهد که آسیب به DNA میتوکندری و نقص عملکردی آن می‌تواند منجر به اختلال در مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو گردد. مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو شامل ۵ کمپلکس چند زیر واحدی می‌باشد که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد. الکترون‌ها از NADH به اکسیژن مولکولی از طریق یک زنجیره انتقال الکترون منتقل می‌شوند و اکسیژن مولکولی به آب احیا می‌شود (۳). جهش‌های ژن‌های میتوکندری ممکن است باعث نقص‌هایی در فسفریلاسیون اکسیداتیو شوند. ارگان‌هایی نظیر مغز، قلب و عضلات اسکلتی شدیداً به انرژی و بنابراین به نقص‌های متابولیسم آن وابسته هستند. از اختلالات میتوکندریایی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: نقص‌های زنجیره انتقال الکترون، فسفریلاسیون اکسیداتیو، چرخه کربس و اکسیداسیون اسیدهای چرب، افزایش تولید انواع اکسیژن‌های رادیواکتیو، استرس و آسیب‌های اکسیداتیو، کاهش بیوزن میتوکندری، افزایش آسیب‌های ژنوم میتوکندری و تغییراتی در نفوذپذیری منافذ غشایی میتوکندری (۶،۷). به‌طور مثال، در طی مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو، ۵٪ اکسیژن به آنیون‌های سوپر اکسید یا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS= Reactive Oxygen Species) تبدیل می‌شود (۸). استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌تواند در ایجاد و پیشرفت پدیده آترواسکلروز از طریق آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA میتوکندری نقش داشته باشد (۹). به‌عنوان مثال، گونه‌های فعال اکسیژن منجر به تغییر

روش بررسی:

این مطالعه از نوع مورد- شاهدی بوده که با نمونه‌های در دسترس انجام گرفته است. در این تحقیق ۹۰ بیمار مبتلا به آترواسکلروز عروق کرونری و ۹۵ فرد سالم بدون هیچ سابقه خانوادگی بیماری‌های قلبی-عروقی، مورد مطالعه قرار گرفتند. سن بیماران این مطالعه بین ۴۵ تا ۶۵ سال بود که از سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۵ به مرکز قلب بیمارستان افشار یزد ارجاع داده شده بودند. مبنای تشخیص بالینی این بیماری، بر اساس آزمایشات آنژیوگرافی عروق کرونری بود. در این تحقیق بیمارانی با گرفتگی بیش از ۵۰٪ در حداقل یکی از عروق کرونری که با روش آنژیوگرافی تعیین شده بود مورد بررسی قرار گرفتند. میزان گرفتگی عروق کرونری افراد سالم نیز با روش آنژیوگرافی توسط پزشک متخصص بالینی بررسی شد و میزان گرفتگی عروق آن‌ها صفر تا ۲۰٪ تعیین شد. به منظور نمونه‌گیری خون و انجام طرح، از کمیته اخلاق در پژوهش زیست‌شناسی-دانشگاه یزد مجوز لازم اخذ شد و تمام افراد مورد مطالعه رضایت نامه تدوین شده را آگاهانه امضا کردند. استخراج DNA از خون افراد بیمار و سالم با روش استاندارد رسوب نمکی انجام گرفت (۱۱). جهت اطلاع از کمیت ژنوم استخراج شده، از روش اسپکتروفتومتری با نور ماورا بنفش استفاده شد.

ناحیه‌ای از ژن‌های ATP6، ND3 و COX3 (GenBank: NC_012920.1) با پرایمرهای اختصاصی توسط PCR تکثیر گردید. پرایمرهای مورد استفاده با استفاده از نرم‌افزار Gene runner طراحی شد و توسط شرکت تکاپوزیست ساخته شد (جدول شماره ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۳/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۲/۵ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (۲/۵ میکرومولار)، ۰/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیماز Taq و DNA حدود ۱۰۰ نانوگرم انجام گردید. واکنش PCR در ۳۰ سیکل صورت گرفت و هر سیکل در سه مرحله حرارتی شامل مرحله واسرشتی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر به الگو در دمای ۵۶ و ۵۷ درجه سانتی‌گراد (هر دو واکنش) و به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند.

جدول شماره ۱: پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن‌های ATP6، ND3 و COX3 میتوکندریایی

(GenBank: NC_012920.1)

ناحیه تکثیر شده	منطقه تکثیر شده توسط پرایمر	پرایمر رفت (Forward)	پرایمر برگشت (Reverse)	طول محصول (جفت باز)
ATP6, ND3, COX3	۸۶۸۱ تا ۹۰۵۰	5'-CCAAATAGGTGCATGAGTAG-3'	5'-TAACCTCAAAACAAATGATA-3'	۳۷۰
	۸۹۰۱ تا ۹۲۳۹	5'-AGCCCACTTCTTACCACAAG-3'	5'-ACTATATGATAGGCATGTGA-3'	۳۳۸
	۹۱۰۶ تا ۹۴۴۰	5'-GCCTTTTGGACAGGTGGTG-3'	5'-ACAATTCTAATTCTACTGAC-3'	۳۳۵
	۹۵۱۹ تا ۹۷۰۲	5'-AATAAGCAGTGCTTGAATTA-3'	5'-AGCCTAGCCCCCTACCCCCCAA-3'	۱۸۴
	۹۸۵۱ تا ۱۰۱۵۰	5'-CACTATCTGCTTCATCCGCC-3'	5'-ATGTAGCCGTTGAGTTGTGG-3'	۲۹۹

قرار گرفتند. به این منظور، ۶ میکرولیتر از محصول حاصل از PCR با ۶ میکرولیتر از رنگ لودینگ بافر SSCP (۹۵٪ فرمامید، ۱۰ میکرومول NaOH، ۰/۰۵٪ بروموفنول)

محصولات حاصل از PCR جهت بررسی وجود تغییرات نوکلئوتیدی، مورد آنالیز SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

بلو، ۰/۰۵ زایلین سیانول) مخلوط گردید و مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا دو رشته DNA دنا توره شوند و سپس نمونه ها سریعاً به داخل ظرف یخ منتقل گردید تا از اتصال مجدد دو رشته جلوگیری شود و به مدت ۵ دقیقه در آن نگه داشته شد تا کنفورماسیون مخصوص هر رشته شکل بگیرد. در نهایت مخلوط حاصل، به ژل پلی آکریل آمید ۸٪ با بفر ۰.۵X TBE (PH 8.3) منتقل گردید. قطعات DNA افراد بیمار و کنترل به صورت کنار هم آنالیز شدند و هر تفاوتی در الگوی باندینگ بین بیماران و افراد کنترل، نشان دهنده جهش های هموپلاسمی و یا هتروپلاسمی در نظر گرفته می شود. دستگاه الکتروفورز به منبع تغذیه که بر روی جریان ۳۵ میلی آمپر تنظیم شده بود، وصل شد و حدود ۶ ساعت الکتروفورز گردید. در نهایت جهت ظهور باندها و رنگ آمیزی ژل از نیترات نقره استفاده گردید. جهت تأیید نتایج، نمونه های مشکوک و دارای شیفیت باندی متفاوت، برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن (کره) ارسال گردید.

قطعات DNA افراد بیمار و کنترل به صورت کنار هم آنالیز شدند و هر تفاوتی در الگوی باندینگ بین بیماران و افراد کنترل که نشان دهنده جهش های

هموپلاسمی و یا هتروپلاسمی است (۱۲). جهت تعیین تغییر نوکلئوتیدی برای تعیین توالی با توالی یاب ABI 3700 capillary ارسال شد.

محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای معرفی شده توالی یابی شدند. تجزیه و تحلیل توالی با استفاده از نرم افزار Chromas Lite صورت گرفت. هم ردیفی توالی به کمک نرم افزار آنالیزی MEGA 4 با توالی مرجع mtDNA انسانی (Gene Bank ID: NC_012920.1) مقایسه شدند. پایگاه داده Mitomap برای بررسی واریانت های توالی ژنوم میتوکندریایی استفاده شد. داده های به دست آمده حاصل از آزمایشات با تست آماری فیشر (Fisher's exact) و توسط نرم افزار آماری Graphpad prism software برای به دست آوردن P-value مورد بررسی قرار گرفت و سطح معنی دار کمتر از ۰/۰۵ انتخاب شد.

یافته ها:

در این تحقیق ۹۰ بیمار با گرفتگی ۵۰٪ عروق کرونری و میانگین سنی $56/3 \pm 7/6$ و ۹۵ فرد سالم با میانگین سنی $54/2 \pm 7/20$ مورد بررسی قرار گرفتند (جدول شماره ۲).

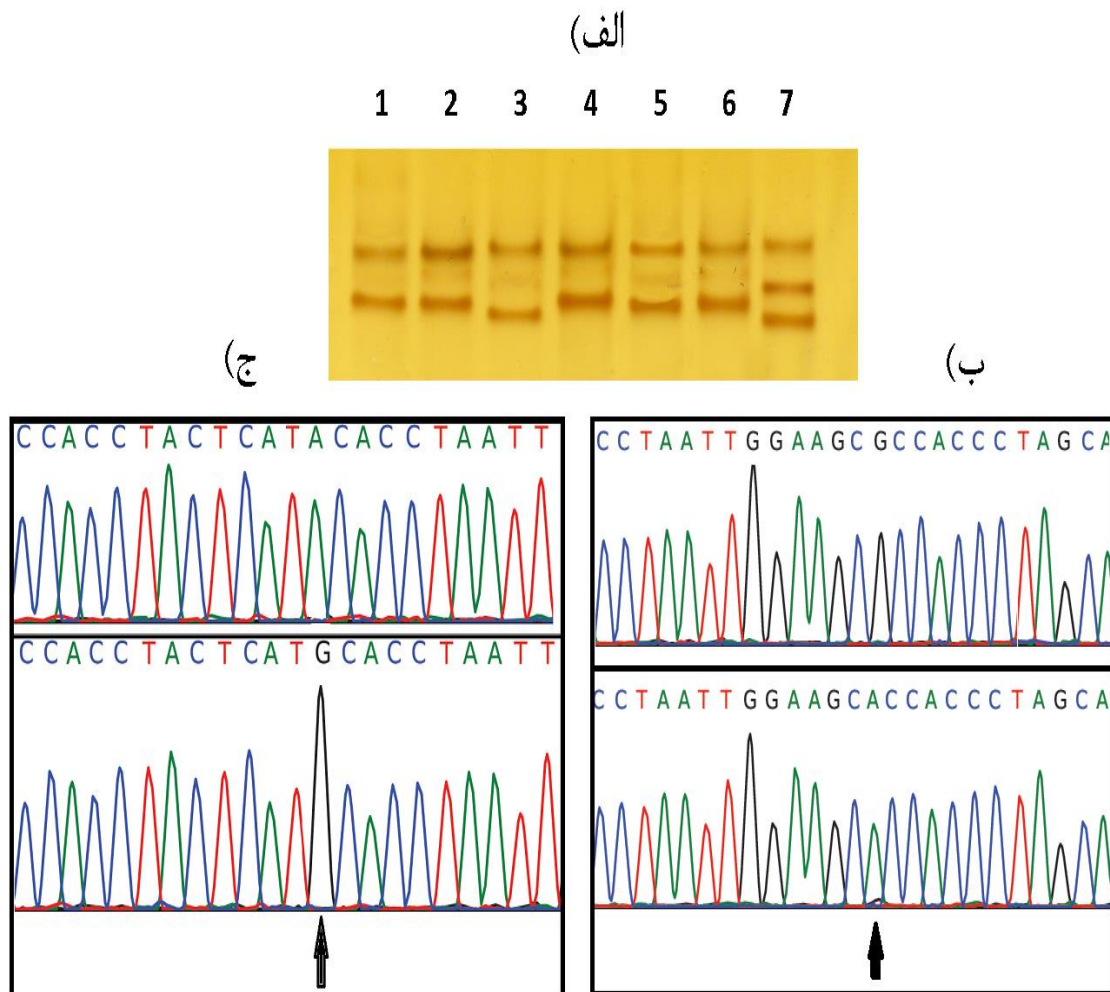
جدول شماره ۲: مشخصات بیماران

متغیر	گروه بیمار (۹۰ نفر)	گروه شاهد (۹۵ نفر)
جنس مذکر (درصد)	۵۶	۵۴
متوسط سن (سال)	$56/3 \pm 7/6$	$54/2 \pm 7/2$
استعمال سیگار (درصد)	۲۵/۶	۱۶/۴
کلسترول تام (میلی گرم بر دسی لیتر)*	$208/3 \pm 51/4$	$180/2 \pm 45/6$
LDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	$125/5 \pm 42/6$	$113/1 \pm 45$
HDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	$45/4 \pm 8/5$	$46/6 \pm 11/5$
TGs (میلی گرم بر دسی لیتر)*	$201/3 \pm 103/4$	$145/6 \pm 93/4$
شاخص توده بدن (کیلوگرم/متر مربع)*	$25/3 \pm 1/1$	$25/2 \pm 1/9$

*: $P < 0/05$

اسید آمینه آلانین به تیروزین تبدیل می‌شود. این واریانت نیز در یک بیمار مشاهده شد و یک تغییر هم معنی هتروپلاسمیک نیز در موقعیت m.9162C>T در دو بیمار شناسایی شد. هر سه این تغییرات نوکلئوتیدی در ژن 6 ATPase قرار دارند (تصویر شماره ۱).

بررسی نتایج حاصل از SSCP منجر به تشخیص ۶ تغییر نوکلئوتیدی در این نواحی از ژنوم میتوکندری شد که عبارت‌اند از: تغییر هموپلاسمی هم معنی در موقعیت m.9034G>A که در یک بیمار شناسایی شد. دیگری تغییر در موقعیت m.9055G>A بود که طی آن



تصویر شماره ۱: تغییرات نوکلئوتیدی در ژن 6 ATPase

(الف) نمونه‌ای از ژل پلی آکریل آمید حاصل رنگ آمیزی با نیترات نقره با هدف غربالگری جهش‌ها به کمک روش SSCP؛ در این ژل، نمونه‌های ۳ و ۷ شیف‌بندی را نشان می‌دهند که به ترتیب مربوط به جهش‌های m.9055G>A و m.9034G>A هستند؛ نمونه ۱ مربوط به فرد کنترل سالم و نمونه‌های ۲، ۴، ۵ و ۶ مربوط به افراد بیمار فاقد جهش می‌باشد؛ (ب) توالی فرد مبتلا دارای جهش m.9055G>A (ج) توالی فرد مبتلا دارای جهش m.9034G>A می‌باشد (محل جهش با فلش نشان داده شده است).

هموپلاسمی m.9929C>A در دو بیمار شناسایی شد که منجر به تغییر اسید آمینه تیروزین به کدون پایان می‌شود. دو جهش اخیر در ژن COX3 یافت شدند. لیست

همچنین جهش هم معنی هموپلاسمی m.9602A>G مربوط به ژن ND3 در یک بیمار، جهش هم معنی هموپلاسمی m.9899T>C در دو بیمار و جهش

جهش‌هایی که در بیماران عروق کرونری یافت شدند، در جدول شماره ۳ آورده شده است.

بحث:

شواهد زیادی وجود دارند که نقص میتوکندریایی در هر دو حالت پیری طبیعی و آترواسکلروز رخ می‌دهد. نقص در میتوکندری می‌تواند منجر به اختلال در مسیر اکسیداتیو فسفریلاسیون، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و اختلال در تنظیم کلسیم شود. این اثرات، آپوپتوز و پیری را که فرایندهای کلیدی در گسترش پلاک‌های آترواسکلروز هستند، تشدید می‌کند (۱۰، ۱۳).

DNA میتوکندریایی انسان، ۱۳ پلی پپتید را کد می‌کند که برای سیستم تولید انرژی میتوکندری، اکسیداتیو فسفریلاسیون، ضروری هستند. همچنین کد کننده ۲۲ نوع tRNA و ۲ نوع rRNA است که برای بیان این پروتئین‌ها مورد نیاز می‌باشند؛ بنابراین هرگونه جهش در نواحی کد کننده DNA میتوکندری

می‌تواند تولید انرژی میتوکندریایی را تغییر دهد (۱۴، ۱۵). کمپلکس V (ATP سنتتاز) به عنوان آخرین آنزیمی است که به طور مستقیم در تولید ATP نقش دارد و شامل ۱۴ زیر واحد است که دوتای آن‌ها ATPase 6 و ATPase 8 توسط ژنوم میتوکندری کد می‌شوند. هر جهش موثر در این زیرواحدها باعث از دست رفتن تولید ATP در بافت‌هایی با بیشترین نیاز به انرژی از جمله مغز، ماهیچه و قلب شده که منجر به آسیب به این بافت‌ها و بیماری می‌شود. از آنجایی که برخی از اسیدآمینه‌های متعلق به ATPase 6 در گونه انسانی حفاظت شده هستند، هرگونه تغییری در این اسیدهای آمینه به طور بالقوه بیماری‌زا است. علاوه بر این اسیدهای آمینه‌ای که در دیگر پستانداران و پروکاریوت‌ها در اشتراک با انسان هستند، نیز حفاظت شده شناخته می‌شوند که جایگزینی آن‌ها با دیگر اسیدهای آمینه بی‌شک به خاطر تغییر در ساختار سوم ATPase 6 بیماری‌زا می‌باشد (۱۶).

جدول شماره ۳: تغییرات نوکلئوتیدی در بیماران مبتلا به عروق کرونری

ژن	جایگاه	تغییر توالی	تغییر اسیدآمینه	تعداد بیماران	هتروپلاسمی / هموپلاسمی
MT-ATP6	۹۰۳۴	G>A	Syn: M-M	۱	هموپلاسمی
MT-ATP6	۹۰۵۵	G>A	Non Syn: A-T	۱	هموپلاسمی
MT-ATP6	۹۱۶۲	C>T	Syn: Y-Y	۲	هتروپلاسمی
MT-COX3	۹۶۰۲	A>G	Syn: L-L	۱	هموپلاسمی
MT-COX3	۹۸۹۹	T>C	Syn: H-H	۲	هموپلاسمی
MT-COX3	۹۹۲۹	C>A	Non Syn: Y-X	۲	هتروپلاسمی

این مطالعه به بررسی تغییرات نوکلئوتیدی احتمالی در ژن‌های *ATP6*، *ND3* و *COX3* در ۹۰ بیمار مبتلا به آترواسکلروز پرداخته است. پزشک معالج از طریق آنژیوگرافی گرفتگی عروق بیش از ۵۰٪

را در همه بیماران تشخیص داد. در حالی که افراد نمونه سالم، فاقد گرفتگی‌های عروق قلبی بودند. با بررسی نتایج SSCP، ۶ جهش در این افراد شناسایی شد. m.9055G>A یک پلی مورفیسم تک

نوکلئوتیدی است که برای اولین بار در بیماران مبتلا به آترواسکلروز مشاهده شده است. طی این تغییر نوکلئوتیدی، اسید آمینه غیر قطبی و آب‌گریز آلانین به اسید آمینه آروماتیک، غیر قطبی و آب‌دوست تیروزین تبدیل می‌شود. این SNP در ناحیه حفاظت شده پروتئین قرار دارد و بنابراین به احتمال زیاد اثر مخربی روی ساختار پروتئین دارد.

فراوانی واریانت G9055A به صورت ۱۰/۵٪ و ۱۸/۵٪ در بیماران مبتلا به سرطان سینه گزارش شده است که نشان می‌دهد این پلی مورفیسم خطر پیشرفت سرطان سینه را افزایش می‌دهد. به علاوه فراوانی این پلی مورفیسم به میزان ۱۰٪ در سرطان پانکراس، ۵۷٪ و ۱۰۰٪ به ترتیب در آدنوم های لوله و پرزها گزارش شده است (۱۷). همچنین در دیگر بررسی‌ها مشخص شده است که این چندشکلی یک عامل حفاظتی در زنان قفقازی مبتلا به پارکینسون می‌باشد (۱۸). با توجه به این مطالعات می‌توان پیشنهاد کرد که واریانت m.9055G>A تأثیر پیش‌برندگی در سرطان دارد، درحالی‌که برای اختلالات و بیماری‌های عصبی-عضلانی نامطلوب است (۱۷)؛ بنابراین می‌توان احتمال داد که این SNP که برای اولین بار در آترواسکلروز گزارش می‌شود، می‌تواند در بیماری‌زایی این اختلال قلبی نیز موثر باشد.

تغییر نوکلئوتیدی شناسایی شده دیگر، یک واریانت هم معنی m.9034G>A بود که برای اولین بار گزارش می‌شود. طی این تغییر نوکلئوتیدی، کدون AUG مربوط به اسید آمینه متیونین به دیگر کدون این اسید آمینه یعنی AUA تبدیل می‌شود. ژنوم میتوکندری برخلاف ژنوم هسته دو کدون برای متیونین دارد. کدون AUA در ژنوم هسته کد کننده ایزولوسین می‌باشد. در میتوکندری مهره‌داران تنها یک tRNA برای ترجمه این دو کدون وجود دارد که دارای آنتی کدون 3'-CAU-5' می‌باشد. این tRNA از این لحاظ که در جایگاه لغزش به جای U دارای C می‌باشد، یک tRNA استثنایی است و

در نتیجه می‌تواند ایجاد پیوند واتسون-کریک با AUG و پیوند لغزنده با AUA کند. از آنجایی که کدون AUG علاوه بر کدون متیونین، یک کدون آغازی می‌باشد و کدون AUA در طول ژنوم بیشتر از AUG تکرار می‌شود. احتمالاً، شروع ترجمه با آنتی کدون متناظر با AUG در مهره‌داران با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد. ضمن این که مشخص شده است در ژنوم میتوکندری، کدون AUA در مقایسه با AUG بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹، ۲۰)؛ بنابراین می‌توان استنباط کرد که تغییر توالی AUG به AUA از آنجایی که روی اتصال tRNA به این کدون تأثیر می‌گذارد، می‌تواند بر روی سرعت و کیفیت ترجمه هم موثر باشد (۲۱).

آنزیم سیتوکروم C اکسیداز، آنزیم نهایی (کمپلکس IV) زنجیره تنفسی می‌باشد و در انتقال عامل‌های احیا کننده از سیتوکروم C به اکسیژن مولکولی نقش دارد (۲۲). آنزیم سیتوکروم C اکسیداز از ۱۳ زیر واحد تشکیل شده است. سه زیر واحد از این آنزیم توسط mtDNA کد می‌شود. زیر واحدهای کد کننده میتوکندری از لحاظ تکاملی کاملاً حفاظت شده می‌باشند (۲۳، ۲۴).

تغییر نوکلئوتیدی هم معنی و هموپلاسمی m.9899T>C مربوط به اسید آمینه هیستیدین می‌باشد که در توالی کد کننده ژن COX3 که زیر واحد سوم سیتوکروم C اکسیداز را کد می‌کند، رخ می‌دهد. این تغییر نوکلئوتیدی یک پلی مورفیسم نقطه‌ای خاموش است که هیچ تغییری در توالی پروتئینی ایجاد نمی‌کند (CAT به CAC تبدیل می‌شود). این نوع جهش در ارتباط با کارسینوم های پاپیلاری تیروئید که در مرحله پیشرفته سرطان در تومورها مشاهده شده است و در سندرم انسفالوپاتی نیز گزارش شده است (۲۵).

تغییر نوکلئوتیدی هموپلاسمی m.9929C>A منجر به جایگزینی اسید آمینه تیروزین با کدون ختم در ناحیه حفاظت شده پروتئین COX3 می‌گردد. طی این جهش ۲۱ اسید آمینه انتهایی پروتئین ترجمه نمی‌شود و

از ساختار پروتئین حذف می‌گردد. این ناحیه از پروتئین بخشی از ساختار عرض غشایی است و از نظر ساختار دوم از نوع هلیکال تشخیص داده شده است. تاکنون این جهش در هیچ بیماری دیگری گزارش نشده است. با توجه به مطالعات اخیر می‌توان گفت پلی مورفیسم های ژنوم میتوکندری با تأثیر بر روی مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن، می‌تواند در پیشرفت فرایند آترواسکلروتیک تأثیر بسزایی داشته باشند (۲۶، ۲۷).

نتیجه گیری:

بدیهی است که برای پی بردن به تأثیر این تغییرات نوکلئوتیدی، لازم است اثرشان در پارامترهای عملکردی مانند مصرف اکسیژن میتوکندریایی، تولید

رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سطح آنتی‌اکسیدان‌ها، پتانسیل غشاء، توده میتوکندریایی و غیره بررسی شود. بر اساس نتایج ما، این واریانت‌ها احتمالاً نقش ثانویه در بیماری آترواسکلروز داشته و ممکن است باعث تداخل عملکرد ناقص میتوکندری و بیماری ایفا نماید. در نتیجه، پیشنهاد ما آنالیز بیشتر ژن‌های میتوکندری و تعیین ارتباط دقیق آن‌ها با بیماری آترواسکلروز می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه یزد انجام گرفته است و مراتب امتنان خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه اعلام می‌گردد. از تمام بیماران رضایت‌نامه جهت این مطالعه دریافت شده است و از آن‌ها به علت همکاری‌شان قدردانی می‌شود.

منابع:

1. Kovacic S, Bakran M. Genetic susceptibility to atherosclerosis. *Stroke Res Treat*. 2012; 3(6): 29-41.
2. Harrison CM, Pompilius M, Pinkerton KE, Ballinger SW. Mitochondrial oxidative stress significantly influences atherogenic risk and cytokine-induced oxidant production. *Environ Health Perspect*. 2011; 119(5): 676-81.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407(6): 233-41.
4. Maack C. Orphaned mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2016; 109(1): 6-8.
5. Chen Q, Lesnefsky EJ. Heart mitochondria and calpain 1: Location, function, and targets. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852(11): 2372-8.
6. Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AH, Wang DL. Shear-induced endothelial mechanotransduction: The interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci*. 2014; 21: 3.
7. Sobenin IA, Sazonova MA, Ivanova MM, Zhelankin AV, Myasoedova VA, Postnov AY, et al. Mutation C3256T of mitochondrial genome in white blood cells: novel genetic marker of atherosclerosis and coronary heart disease. *PloS one*. 2012; 7(10): e46573.
8. Suvorava T, Kojda G. Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: Lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787(7): 802-10.
9. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, De Pascalis S, Muscari A. The emerging role of cardiovascular risk factor-induced mitochondrial dysfunction in atherogenesis. *J Biomed Sci*. 2009; 16: 112.
10. Yu E, Mercer J, Bennett M. Mitochondria in vascular disease. *Cardiovasc Res*. 2012; 95(2): 173-82.
11. Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V. Human DNA extraction methods: Patents and applications. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2011; 5(1): 1-7.
12. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290(5806): 457-65.
13. Nicholls TJ, Rorbach J, Minczuk M. Mitochondria: Mitochondrial RNA metabolism and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45(4): 845-9.

14. Houshmand M, Kasraie S, Etemad Ahari S, Moin M, Bahar M, Zamani A. Investigation of tRNA and ATPase 6/8 gene mutations in Iranian ataxia telangiectasia patients. *Arch Med Sci.* 2011; 7(3): 523-7.
15. Sobenin IA, Sazonova MA, Postnov AY, Salonen JT, Bobryshev YV, Orekhov AN. Association of mitochondrial genetic variation with carotid atherosclerosis. *PloS one.* 2013; 8(7): e68070.
16. Piryaee F, Houshmand M, Aryani O, Dadgar S, Soheili ZS. Investigation of the Mitochondrial ATPase 6/8 and tRNA(Lys) Genes Mutations in Autism. *Cell J.* 2012; 14(2): 98-101.
17. Ghaffarpour M, Mahdian R, Fereidooni F, Kamalidehghan B, Moazami N, Houshmand M. The mitochondrial ATPase 6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase 8 gene in breast cancer patients. *Cancer Cell Int.* 2014; 14(1): 21-5.
18. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(4): 804-11.
19. Xia X. Mutation and selection on the anticodon of tRNA genes in vertebrate mitochondrial genomes. *Gene.* 2005; 345(1): 13-20.
20. Xia X, Huang H, Carullo M, Betran E, Moriyama EN. Conflict between translation initiation and elongation in vertebrate mitochondrial genomes. *PloS one.* 2007; 2(2): e227.
21. Heidari MM, Khatami M, Danafar A, Dianat T, Farahmand G, Talebi AR. Mitochondrial genetic variation in Iranian infertile men with varicocele. *Int J Fertil Steril.* 2016; 10(3): 303-9.
22. DiMauro S, Lombes A, Nakase H, Mita S, Fabrizi GM, Tritschler HJ, et al. Cytochrome c oxidase deficiency. *Pediatr Res.* 1990; 28(5): 536-41.
23. Song Z, Laleve A, Vallieres C, McGeehan JE, Lloyd RE, Meunier B. Human Mitochondrial Cytochrome b Variants Studied in Yeast: Not All Are Silent Polymorphisms. *Hum Mutat.* 2016; 37(9): 933-41.
24. Rak M, Benit P, Chretien D, Bouchereau J, Schiff M, El-Khoury R, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci.* 2016; 130(6): 393-407.
25. Yeh JJ, Lunetta KL, van Orsouw NJ, Moore FD, Mutter GL, Vijg J, et al. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene.* 2000; 19(16): 2060-6.
26. Golubenkov MV, Salakhov RR, Makeeva OA, Goncharova IA, Kashtalap VV, Barbarash OL, et al. [Mitochondrial DNA polymorphism association with myocardial infarction and prognostic signs for atherosclerosis]. *Mol Biol.* 2015; 49(6): 968-76.
27. Heidari MM, Derakhshani M, Sedighi F, Foruzan-Nia SK. Mutation Analysis of the mitochondrial trna genes in Iranian coronary atherosclerosis patients. *Iran J Public Health.* 2017; 46(10): 1379-85.

The study of mitochondrial ATP6, ND3 and COX3 gene nucleotide variations in Iranian patients with atherosclerosis by PCR-SSCP

Heidari MM^{1*}, Hadadzadeh M², Mirzaeian F¹, Mirjalili M¹

¹Biology Dept., Yazd University, Yazd, I.R. Iran; ²Cardiac Surgery Dept., Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I.R. Iran.

Received: 4/Sep/2016 Accepted: 21/Dec/2016

Background and aims: Atherosclerosis is a complex arterial disease that is caused due to the interaction of genetic and environmental factors. Mutations in the mitochondrial genome have probably a direct effect on increased oxidative stress and thereby cause progression of the disease. The aim of the current study was to identify the possible nucleotide changes in the mitochondrial ATP6, ND3 and COX3 genes in Iranian patients with atherosclerosis.

Methods: In this case-control study, DNA was extracted from peripheral blood of 90 patients with atherosclerosis and 95 healthy individuals by standard method. The regions of the mitochondrial genome including ATP6, ND3 and COX3 genes were studied by PCR-SSCP; and banding shift specimens were sequenced to determine the exact nucleotide changes. The obtained data were analyzed using the Fisher's exact test and GraphPad prism software.

Results: The results of SSCP and DNA sequencing lead to the detection of three nucleotide changes in ATP6 gene including a synonymous polymorphism at position m.9034 G>A, and an SNP at position m.9055 G>A, in which alanine is converted to tyrosine and synonymous heteroplasmic variant at m. 9162C>T. Also, it was found three homoplasmic nucleotide variations including synonymous m.9602A>G, m.9899T>C related to histidine amino acid and homoplasmic variant m.9929C>A that resulted in changing of tyrosine to stop codon.

Conclusion: Since it has been proven, m.9055G>A variant increases the risk of developing breast cancer, and on the other hand, this polymorphism has also been reported in the Caucasian population of Parkinson's; Therefore, it can be said that the combination of this mutation with other predisposing factors increases the severity of coronary heart disease. Investigating other mitochondrial genes could be regarded important in order to find the the relationship between nucleotide changes of mitochondrial genes cardiovascular diseases.

Keywords: Atherosclerosis, Mitochondrial Genome, Nucleotide Variations, ATP6, ND3, COX3, PCR-SSCP.

Cite this article as: Heidari MM, Hadadzadeh M, Mirzaeian F, Mirjalili M. The study of mitochondrial ATP6, ND3 and COX3 gene nucleotide variations in Iranian patients with atherosclerosis by PCR-SSCP. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 19(6): 73-82.

*Corresponding author:

Biology Dept., Yazd University, Yazd, I.R. Iran. Tel: 00989133535985,
E-mail: heidarimm@yazd.ac.ir